

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 547号	学位授与年月日	平成21年 3月18日
氏 名	辻 孝 之		
論文題目	<p>The dimethylthiourea-induced attenuation of cisplatin nephrotoxicity is associated with the augmented induction of heat shock proteins (ジメチルチオウレアによるシスプラチン腎毒性の軽減は熱ショック蛋白の誘導亢進に関連している)</p>		

博士(医学) 辻 孝 之

論文題目

The dimethylthiourea-induced attenuation of cisplatin nephrotoxicity is associated with the augmented induction of heat shock proteins

(ジメチルチオウレアによるシスプラチン腎毒性の軽減は熱ショックタンパクの誘導亢進に関連している)

論文内容の要旨

[はじめに]

シスプラチンは様々な癌に対し、幅広く使用される抗癌剤であるが、腎毒性などの副作用のためその使用が限られている。

シスプラチン誘発急性腎不全のモデルにおいて、活性酸素種などの酸化ストレス及び $\text{TNF}\alpha$ などの炎症性サイトカインを中心とした炎症により惹起される腎尿細管細胞のアポトーシスがこの病態生理に重要であることが多く報告されている。我々は過去に、ヒドロキシルラジカルを特異的にスカベンジするジメチルチオウレア (DMTU) が、シスプラチンによる腎障害をほぼ正常レベルまで軽減し、強力に腎尿細管細胞のアポトーシスを抑制することを報告した。DMTU はデスレセプターを介するアポトーシス、p38MAP キナーゼ、 $\text{TNF}\alpha$ や $\text{NF}\kappa\text{B}$ 、p53 の活性化などを抑制するという酸化ストレス消去以外の作用も報告されている。

DMTU はシスプラチン誘発急性腎不全抑制効果が強いことから、その作用には酸化ストレス抑制以外の機序が関与している可能性が推定できる。今回我々は、アポトーシス関連シグナル伝達物質を制御している分子の一つである熱ショックタンパク (Heat Shock Protein: HSP) の発現の関与を検討した。HSP72 が過剰発現した腎臓は、腎虚血再還流による腎尿細管細胞のアポトーシスや、酢酸ウラニウムやシスプラチンなどの腎毒性物質による腎尿細管細胞のアポトーシスに対し抵抗性を獲得することが知られている。近年様々な HSP の細胞障害に対する働きが明らかになり、HSP72 に加えて他の HSP が腎尿細管細胞のアポトーシスに関与している可能性がある。組織障害の抗酸化剤による軽減に伴う HSP 発現を検討した過去の論文では、抗酸化剤投与群では HSP 発現が減少しているという結果が報告されている。これらは組織障害軽減の結果としての HSP 発現の軽減を観察しており、抗酸化剤による HSP 発現調節への直接的結果を観察していない。本研究の主な目的はシスプラチン誘発急性腎不全の早期における現象も観察することにより、DMTU の急性腎不全軽減効果における HSP の役割を明らかにすることである。

[材料ならびに方法]

250～300g の雄性 Sprague-Dawley ラット合計 56 匹を使用した。急性腎不全はシスプラチンを生理食塩水に溶解し 5mg/kg を、陰茎静脈より静注することで作成した。シスプラチン単独群 (N=24)、シスプラチン+DMTU 群 (N=24)、正常コントロール群 (N=8) の 3 群に分類した。DMTU はシスプラチン投与 1 時間前に 500mg/kg を腹腔内投与し、以後 12 時間毎に 125mg/kg を 5 日目まで腹腔内投与した。ラットはシスプラチン投与後、1、3 及び 5 日目に屠殺し、血清及び腎臓を採取した。血清クレアチニン濃度、腎尿細管障害スコア (0～4)、尿細管アポトーシス (TUNEL 染色)、酸化ストレス (8-OHdG 染色)、HSP (60、72、73、90、HO-1) の発現 (ウェスタンブロット法、免疫組織染色) を検討した。腎の細胞小器官/細胞膜分画を抽出し、ウェスタンブロット法で Bcl-2 と Bax の細胞内分布を検討した。

[結果]

DMTU は、シスプラチンによる血清クレアチニンの上昇、組織障害、アポトーシスの指標である腎内 TUNEL 陽性細胞数を投与後 3 日目から有意に軽減した。また酸化ストレスの指標である 8-OHdG 陽性細胞も 5 日目では有意に抑制された。HSP60、72、90、HO-1 の発現は 5 日目では DMTU 投与群ではシスプラチン単独群と比較して有意に低下していた。一方、1、3 日目では、HSP60 の発現は DMTU 投与群においてシスプラチン単独群より有意に発現増強を認めた。HSP72、90、HO-1 についても統計学的有意差はないものの、1、3 日目では同様の傾向を認めた。HSP73 の発現については、両群において、正常コントロールレベルと経過を通して同等であった。免疫組織染色では HSP60 は近位尿細管細胞の細胞質に、他の HSP は核を中心に染色された。さらに、Bcl-2 には変化を認めなかったが、DMTU はシスプラチン投与後 3 日目の腎の細胞小器官/細胞膜分画での Bax の増加を抑制した。

[考察]

DMTU 投与群では、早期に一過性に腎内 HSP60 の発現増強を認め、同時に細胞小器官/細胞膜分画での Bax の増加を抑制した。このことは早期の HSP60 発現増強が Bax を介したアポトーシスの軽減に関与している可能性を示している。HSP60 は細胞質で Bcl-2 を除く Bax、Bak、Bcl-XL などのアポトーシス関連タンパクと結合することでこれらを制御しているが、虚血や酸化ストレスなどアポトーシス刺激が加わるとこれらの複合体は解離し、Bax がミトコンドリアに移動することでミトコンドリアを介したアポトーシスが起るとされている。DMTU により増加した HSP60 は、免疫組織染色では、近位尿細管細胞の細胞質に染色された。早期に細胞質に増加した HSP60 が Bax のミトコンドリアへの移動を阻害することにより、アポトーシスを抑制している可能性がある。さらに、3 日目の腎における酸化ストレスマーカーに、DMTU 投与群とシスプラチン単独群で差がないことから、この HSP60 の早期増加は酸化ストレス修飾の結果により誘導されたものではなく、DMTU による特異的な作用であることが示唆される。逆に HSP60、72、90、HO-1 の発現は 5 日目では、DMTU 投与群で有意に減少していたが、これは酸化ストレス軽減による組織障害の軽減を反映しているものと考えられる。

[結論]

DMTU によるシスプラチン誘発急性腎不全の軽減には、HSP60 の早期発現増強により Bax が抑制され、その結果、アポトーシスが抑制されている可能性がある。

論文審査の結果の要旨

癌化学療法において、シスプラチン投与後の腎機能障害は時として重篤な有害事象の一つとなり、その予防のために本剤を減量したり、有効性の低い誘導体に変更したりすることを余儀なくされることが臨床的に問題とされている。

申請者は、ラットのシスプラチン誘発急性腎不全モデルにおいて、ジメチルチオウレア (DMTU) が、シスプラチンによる腎障害をほぼ正常レベルまで軽減し、強力に腎尿細管細胞のアポトーシスを抑制すること、また DMTU はデスレセプターを介するアポトーシス、p38MAP キナーゼ、TNF α や NF κ B、p53 の活性化などを抑制するという酸化ストレス消去以外の作用を有することに着目し、以下の研究を行った。すなわち、DMTU のシスプラチン誘発急性腎不全抑制効果は、酸化ストレス抑制以外の機序が関与している可能性が推定できることから、アポトーシス関連シグナル伝達物質を制御している分子の一つである熱

ショックタンパク(Heat Shock Protein: HSP)の発現の関与を検討した。

そこで、雄性 Sprague-Dawley ラットを用いて、シスプラチン誘発急性腎不全モデルを作成し、シスプラチン単独群(N=24)、シスプラチン+DMTU 群(N=24)、正常コントロール群(N=8)の3群に分類した。ラットは、シスプラチン投与後、1、3及び5日目に屠殺し、血清及び腎臓を採取し、血清クレアチニン濃度、腎尿細管障害スコア(0~4)、尿細管アポトーシス(TUNEL 染色)、酸化ストレス(8-OHdG 染色)、HSP(60、72、73、90、HO-1)の発現(ウェスタンブロット法、免疫組織染色)を検討し、また腎の細胞小器官/細胞膜分画を抽出し、ウェスタンブロット法で Bcl-2 と Bax の細胞内分布も検討した。

その結果、DMTU は、シスプラチンによる血清クレアチニンの上昇、組織障害、腎内 TUNEL 陽性細胞数を投与後3日目から有意に軽減し、8-OHdG 陽性細胞も5日目で有意に抑制された。HSP60、72、90、HO-1 の発現は、5日目では DMTU 投与群ではシスプラチン単独群と比較して有意に低下していた。一方、1、3日目では、HSP60 の発現は DMTU 投与群においてシスプラチン単独群より有意に発現増強を認めた。HSP72、90、HO-1 についても統計学的有意差はないものの、1、3日目では同様の傾向を認めた。HSP73 の発現については、両群において、正常コントロールレベルと経過を通して同等であった。免疫組織染色では HSP60 は近位尿細管細胞の細胞質に、他の HSP は核を中心に染色された。さらに、Bcl-2 には変化を認めなかったが、DMTU はシスプラチン投与後3日目の腎の細胞小器官/細胞膜分画での Bax の増加を抑制した。

以上の結果より、DMTU のシスプラチン誘発急性腎不全抑制効果は、HSP60 の一過性の早期発現増強による Bax を介したアポトーシスの抑制が一部関与している可能性がある結論づけた。

審査委員会は、今回の研究により、DMTU のシスプラチン誘発急性腎不全抑制効果の機序の解明に繋がること示されたことを高く評価するとともに、本研究結果は、シスプラチン投与後の腎機能障害に対する新たな治療法を開発する上で、臨床的有用性が高いと判断した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) ラットのシスプラチン誘発腎不全モデルの発生機序について
- 2) シスプラチン誘発腎不全モデルにおける腎の病理変化について
- 3) 免疫染色の再現性、判定法ならびに判定基準について
- 4) DMTU 単独投与群で推察される変化について
- 5) DMTU 投与において CDDP の抗癌効果に対する影響について
- 6) DMTU 投与における他のスカベンジャーとの関係について
- 7) 他の腎不全モデルにおける DMTU 投与と HSP の発現について
- 8) Bax 以外を介したアポトーシスの可能性について
- 9) HSP60 の発現を直接的に見る方法について
- 10) 動物の具体的な屠殺法について
- 11) 本研究結果の臨床的意義ならびに将来的な臨床的応用について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者

主査 大園 誠一郎

副査 峯田 周幸 馬場 聡